

Eine Methode zur Bestimmung des intrazellulären
Kalium-Gehaltes der Lymphozyten

Curt Friedrich Schuler

1975

Aus der Chirurgischen Poliklinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. Fritz Holle

Eine Methode zur Bestimmung des intrazellulären
Kalium-Gehaltes der Lymphozyten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde des Fachbereichs Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Curt Friedrich Schuler
aus
München

1975

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. A. Doenicke

Mitberichterstatter: Prof. Dr. F. Holle

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 31.7.1975



Herrn Professor Dr. A. DOENICKE danke ich für die freundliche Überlassung des Themas und für seine allzeit bereitwillige Unterstützung bei der Arbeit, sowie für seinen wertvollen Rat und die Korrektur der Arbeit.

Herrn Professor Dr. F. HOLLE danke ich für die Übernahme des Co-Referats.

Herrn Professor Dr. R. MARX danke ich für die freundlicherweise gewährte Erlaubnis, einen Teil des Isolations-Verfahrens im hämatologischen Labor der I. Medizinischen Klinik der Universität München durchzuführen.

Herrn Professor Dr. D. MICHEL danke ich für die freundlicherweise gewährte Möglichkeit, die Kalium-Bestimmungen im Labor der Stiftsklinik Augustinum durchzuführen.

Frau AIFF danke ich für die Durchführung der Kalium-Bestimmungen im Labor der Stiftsklinik Augustinum.

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG	5
METHODE	6
Methode der Isolation von Lymphozyten	8
Benötigte Materialien für den Arbeits- vorgang	8
Vorgehen (Vorbereitung)	9
Eigentlicher Arbeitsvorgang der Iso- lation und Reindarstellung des Lympho- zyten-Konzentrates.	11
Vorversuche	13
ERGEBNISSE	18
Tabelle der einzelnen Kalium-Bestim- mungen in Lymphozyten	19
DISKUSSION	20
ZUSAMMENFASSUNG	29
LITERATURVERZEICHNIS	30

E I N L E I T U N G

Der weitaus größte Anteil des Kaliums im Körper befindet sich i n t r a z e l l u l ä r. Die K^+ -Konzentration im Plasma stellt oft nur einen unzureichenden Parameter für den Gesamtbestand des Körpers an Kalium dar.

In Anbetracht der Bedeutung des K a l i u m s für die Funktion der Zelle und des gesamten Organismus wird in dieser Arbeit e r s t m a l s eine Methode zur Bestimmung des K^+ -Gehalts der Lymphozyten, sowie der physiologische K^+ -Gehalt der Lymphozyten beschrieben.

M E T H O D E

Die Methode der Bestimmung der intrazellulären K^+ -Konzentration der Lymphozyten läßt sich in z w e i völlig getrennte Arbeitsgänge teilen:

e r s t e n s: Eine zur späteren K^+ -Bestimmung geeignete Methode der Isolation und Reindarstellung unversehrter Lymphozyten.

Die Bestimmung des Reinheitsgrades der endgültigen, zur Kaliumbestimmung vorgesehenen Aufschwemmung des Lymphozytenkonzentrates, d.h. es muß ermittelt werden, in welchem Maße das Lymphozytenkonzentrat mit anderen Zellen und Zellbestandteilen kontaminiert ist.

Außerdem gehört zu diesem Arbeitsgang noch die Ermittlung der Anzahl der Lymphozyten pro Volumeneinheit in der endgültigen Präparation.

z w e i t e n s: Die Messung der Kalium-Konzentration in der Aufschwemmung des Lymphozytenkonzentrates und des als Vergleichs-

wert dienenden Überstandes mittels
eines Atom-Absorptions-Spektographen
nach Art der üblichen K^+ -Konzentra-
tionsbestimmung im Plasma.

Methode der Isolation von Lymphozyten und der Gewinnung und Reindarstellung eines Lymphozyten-Konzentrates.

Um den, während des Isolierungs-Vorganges eintretenden Kalium-Verlust der Lymphozyten möglichst gering zu halten, muß die Zeit zwischen Abnahme des Blutes und Gewinnung des endgültigen Kalium-Konzentrates möglichst kurz sein.

Dazu sind sämtliche, für die Isolierung der Lymphozyten notwendigen Materialien vor Beginn des eigentlichen Isolations-Verfahrens vorzubereiten und auf einer konstanten, den in vivo Bedingungen entsprechenden Temperatur von 37° C zu halten.

Benötigte Materialien für den Vorgang der Isolation und Reindarstellung der Lymphozyten.

"Uromiro-300" (das Röntgen-Kontrastmittel "Uromiro-Jodamid" der Firma Dr. Franz Köhler-Chemie, Alsbach, nach Lizens Bracco, Milano), ein Kombinations-Präparat auf der Grundlage des Jodamids. "Uromiro-300" ist eine 65%ige wäßrige Lösung des Methylglucaminsalzes der Acetylaminomethylacetylaminotrijodbenzoesäure mit einem Jodgehalt von 300 mg/ml.

LP-1 Leuko-Pak Leukocyte Filter der Firma Fenwal Laboratories, Div. of Travenol Laboratories, Inc., Morton Grove, Illinois 60053. Davon wurde die in dem Filter befindliche Nylon-Filter-Watte benötigt.

20 ml dicke Reagenz-Gläser, die zur Zentrifugation geeignet sind.

20 ml Einmal-Spritzen

0,83%ige Ammonium-Chlorid-Lösung

ein Wasserbad

einen Brutschrank

eine Thermo-Zentrifuge

physiologische Kochsalzlösung

eine an der Spitze umgebogene Punktions-Kanüle bzw.

eine Pasteur-Pipette

Liquemin^R bzw. Natrium-Citrat

Whrite'sche Lösung zum Färben der Ausstriche

Im einzelnen wird wie folgt vorgegangen:

Um ein zuverlässiges Ergebnis zu erhalten, müssen Doppel-Bestimmungen bzw. Dreifach-Bestimmungen durchgeführt werden.

Die im folgenden genannten Zahlen-Angaben beziehen sich auf eine e i n z e l n e Bestimmung.

1. 20 ml Einmal-Spritzen werden in folgender Weise mit der aus speziell präparierten Nylon-Fasern bestehenden Watte des Leuko-Pak-Filters vorbereitet:

Ein Leuko-Pak-Filter wird aufgeschnitten, die Watte herausgenommen und in drei 20 ml Einmal-Spritzen, aus welchen zuvor der Spritzen-Kolben entfernt worden ist, gestopft, so daß sich etwa 15 cm^3 in einer Spritze befinden. Dann wird mit einer zuvor an der Spitze umgebogenen Nadel, die zusammengepreßte Watte in den Spritzenausgang hineingezogen. Die so präparierte Spritze wird in einem Brutschrank auf 37° C erwärmt und bis zur Verwendung dort aufbewahrt.

2. Ein 20 ml dickes Reagenz-Glas wird mit 10 ml einer Verdünnung des Röntgen-Kontrastmittels "Uromiro-Jodamid" gefüllt.

Zur Einstellung der für die Lymphozyten-Isolierung erforderlichen Lösung vom spezifischen Gewicht $\rho = 1,076$ werden zu jeweils 100,0 ml dest. Wasser 29,45 ml "Uromiro-300" zugesetzt. Die Verdünnung aus dem Röntgen-Kontrastmittel "Uromiro-300" wird folgend als "Uromiro-Lösung" bezeichnet.

Eigentlicher Arbeitsvorgang der Isolation und Reindarstellung des Lymphozyten-Konzentrates.

Das mit Liquemin^R ungerinnbar gemachte Blut (ca. 5 ml) wird sofort nach Entnahme von der Seite des herausgenommenen Kolbens aus in die mit Leuko-Pak-Watte vorbereiteten Spritzen gefüllt, und dann mit leichtem Druck langsam in die Leuko-Pak-Watte hineingedrückt. Das in der Leuko-Pak-Watte befindliche Blut läßt man in den Spritzen 15 Minuten lang bei 37° C inkubieren. Danach werden die mit der "Uromiro-Lösung" vorbereiteten Reagenz-Gläser sorgfältig mit dem aus der Spritze unter leichtem Druck herausgepreßten Filtrat überschichtet. Der so gewonnene Ansatz wird mit 1900 U/min bei 37° C 25 Minuten lang zentrifugiert. Durch das Zentrifugieren erfolgt eine Sedimentierung der Erythrozyten durch die "Uromiro-Schicht" hindurch gemäß ihrem höheren spezifischen Gewicht. Die Lymphozyten reichern sich aufgrund ihres gegenüber der auf ein spezifisches Gewicht von $\rho = 1,076$ eingestellten "Uromiro-Lösung" geringeren spezifischen Gewichtes als weißer Ring in der Trennschicht zwischen Plasma und "Uromiro-Lösung" an. Der Plasma-Überstand wird soweit als möglich abpipettiert und verworfen. Dabei wird sorgfältig darauf geachtet, daß der Lymphozyten-Ring auf keinen Fall aufgerührt wird. Die Lymphozyten (meist ca. 1 ml)

werden mit Hilfe einer an der Spitze umbogenen Punktions-Kanüle vorsichtig abgesaugt, in ein Zentrifugen-Glas gegeben, mit 0,83%iger Ammonium-Chlorid-Lösung aufgefüllt; im Verhältnis 1 Teil Lymphozyten-Konzentrat zu 3 Teilen Ammonium-Chlorid-Lösung.

Anschließend wird der Ansatz 5 Minuten im Wasserbad bei 37°C schonend geschüttelt und danach ein mehrfaches an physiologischer Kochsalz-Lösung unter Mischung hinzugegeben.

Bei 1200 U/min wird 15 Minuten lang zentrifugiert bis sich die Lymphozyten abgesetzt haben.

Der gesamte Überstand, der etwa Plasma- und Erythrozyten-Stroma sowie vereinzelt Thrombozyten enthält, wird abgehoben und verworfen. Die abgesetzten Lymphozyten werden, um das physiologische Milieu soweit als möglich wieder herzustellen, in physiologischer Kochsalz-Lösung resuspendiert.

Dieser Ansatz wird anschließend bei 2500 U/min 8 Minuten lang zentrifugiert. Der größte Teil des Überstandes wird abpipettiert und zur Messung der K^{+} -Konzentration, welche vom endgültigen Ergebnis der K^{+} -Konzentration des Lymphozyten-Konzentrates abgezogen werden muß, aufgehoben.

Das Sediment, das reine Lymphozyten enthält, wird in dem Rest des Überstandes, der nicht abpipettiert wurde, wieder resuspendiert.

Daraus wird nun eine Probe zur Zählung der Zellen nach Art einer Leukozyten-Zählung in einer Neubauer-Kammer entnommen. Die Anzahl der Zellen pro mm³ wird so bestimmt.

Außerdem wird aus einem Tropfen dieser Lymphozyten-Suspension ein Ausstrich angefertigt und nach Art eines Differenzial-Blutbildes mit Whrite'scher Lösung gefärbt und unter dem Mikroskop betrachtet.

So kann der Reinheitsgrad der Lymphozyten-Präparation lichtoptisch überprüft werden, ebenso läßt sich lichtoptisch eine Aussage darüber machen, ob die Lymphozyten durch den gesamten Isolations-Vorgang entscheidend geschädigt wurden.

Vorversuche:

Bei der Entwicklung der Methode der Isolation wurden auch Versuche durchgeführt, mit denen der Kalium-Verlust der Lymphozyten während des Isolierungs-Vorganges ermittelt werden sollte, und die somit die nachträgliche Rückrechnung auf dem ursprünglichen Kalium-Gehalt, der in vivo besteht, ermöglichen würden.

Dazu wurde zu Beginn des Isolierungs-Vorganges dem mit Liquemin^R ungerinnbar gemachten Vollblut eine Spur ¹³¹J Human-Albumin zugesetzt. Eine

kleine Probe wurde zentrifugiert, die radioaktive Aktivität im Plasma mittels eines Bohrloches ermittelt, und gleichzeitig der Kalium-Gehalt des Plasmas festgestellt. In der Annahme, daß sich ^{131}J Human-Albumin gleichmäßig im Plasma verteilt und sich während des gesamten Isolierungsvorganges wie das Plasma verhält, konnte die Radioaktivität dem Plasma äquivalent gesetzt werden, d.h. zum Beispiel, daß die halbe radioaktive Konzentration in einer späteren Probe einer Verdünnung des Plasma von 1 : 1 entspricht.

Danach wurde die Isolation wie beschrieben durchgeführt. Jeweils nach den einzelnen Schritten der Isolation wurden verschiedene Proben zur Bestimmung ihrer Radioaktivität, sowie ihres Kalium-Gehaltes entnommen. Bei jedem einzelnen Schritt des Versuches mußte die Zeit der Arbeitsgänge strikt eingehalten werden, ebenso wurde jeder zum Verwerfen bestimmte Überstand genau mit seinem Volumen erfaßt.

Es wurde bei diesen Versuchen im einzelnen wie folgt vorgegangen:

1. Eine Probe des durch den Leuko-Pak-Filter gefilterten Vollblutes wird entnommen, zentrifugiert und im Plasma Radioaktivität und Kalium bestimmt.
2. Nach Zentrifugation durch die "Uromiro-Schicht" wurden, sowohl von dem zuvor abpipettierten

und verworfenen Plasma-Überstand als auch aus der Lymphozyten-Konzentration, als auch aus der "Uromiro-Schicht" Proben zur Bestimmung der Radioaktivität und der K^+ -Konzentration entnommen. Die dabei abgemessenen Volumina betrugen für den "Plasma-Überstand" 4,5 ml, für den "Lymphozyten-Ring" 1,5 ml und bei der "Uromiro-Schicht" 8 ml. Die "Uromiro-Schicht" umfaßt jedoch, wie aus der Beschreibung der Methode hervorgeht, 10 ml.

3. Nachdem, nach der Hämolyse mit Ammonium-Chlorid, mit NaCl-Lösung aufgefüllt und zentrifugiert wurde, wird von dem zu verwerfenden Überstand eine Probe zur Bestimmung der Radioaktivität und des K^+ -Gehaltes entnommen. Hierbei hat der abpipettierte Überstand ein Volumen von 8 ml.
4. Bei der letzten Probe wird nicht nur wie bei der "Routine-Methode" der Kalium-Gehalt sowohl des Überstandes als auch der endgültigen Lymphozyten-Suspension bestimmt, sondern auch noch einmal die jeweilige Radioaktivität gemessen.

Die Ermittlung des Kalium-Verlustes der Lymphozyten während des Isolations-Verfahrens sollte dann in folgender Weise erfolgen.

Der Grad der Kontamination einer Probe mit Plasma und damit von aus dem Plasma stammenden Kalium wird durch die gemessene Radioaktivität bestimmt. Der Kalium-Verlust der Lymphozyten während jedes Schrittes des Isolierungs-Vorganges entspricht somit der Differenz zwischen dem in der Probe gemessenen Kalium und dem aus dem Plasma mit Hilfe der Radioaktivität ermittelten Kaliums.

Die Ermittlung des gesamten Kalium-Verlustes während des Isolations-Verfahrens erfolgte nach folgender Formel:

$$\left[K_p^+ \right] - \left[K_o^+ \right] \times \frac{N_p}{N_o} = \left[K_d^+ \right] ; \left[K_d^+ \right] \times V = K^+-\text{Verlust}$$

$$\left[K_p^+ \right] = K^+-\text{Konzentration in der gemessenen Probe}$$

$$\left[K_o^+ \right] = K^+-\text{Konzentration im Serum}$$

$$N_p = \text{Radioaktivität der Probe}$$

$$N_o = \text{Radioaktivität im Serum}$$

$$\left[K_d^+ \right] = K^+-\text{Konzentrations-Zuwachs des "Plasmas"}$$

So sollte die genaue Menge an Kalium ermittelt werden, welche nicht vom ursprünglich schon im Plasma enthaltenen Kalium stammte und somit aus dem Intrazellulärraum in den Extrazellulärraum diffundiert sein mußte. Dies bedeutete, daß dies der Kalium-Verlust der im jeweiligen Ansatz befindlichen Zellen sein mußte. Zumindest nach der Zentrifugation durch

die "Uromiro-Schicht" sind dies bis auf einen verschwindend geringen Anteil an Erythrozyten (5-10%) ausschließlich Lymphozyten.

ERGEBNISSE

Neben der Entwicklung einer Methode zur Isolation und Reindarstellung von unversehrten Lymphozyten, die zur Kalium-Bestimmung des intrazellulären K^+ -Gehaltes von Lymphozyten geeignet ist, wurde der intrazelluläre K^+ -Gehalt eines einzelnen Lymphozyten mit $42,6 \times 10^{-12}$ m val/Lymphozyt ermittelt.

Daraus ergibt sich bei der Annahme eines Durchmessers von 10μ eines durchschnittlichen Lymphozyten, wie er aus den endgültigen Ausstrichen des Lymphozyten-Konzentrates ausgemessen werden konnte, eine intrazelluläre Kalium-Konzentration der Lymphozyten aufgrund der endgültigen Messungen von ca. 81,3 m val/l.

Tabelle der einzelnen Kalium-Bestimmungen in
Lymphozyten aus Vollblut gesunder, junger,
männlicher, freiwilliger Versuchspersonen,
bei welchen der Serum-Kalium-Gehalt stets im
Normbereich lag.

	Gemessener Wert bei Lymphozyten Präparation m val/l A	Gemessener Wert des Überstandes m val/l B	Zahl der Lymphozyten pro mm ³	A minus B m val/l	I	II
1	0,92	0,05	21,200	0,87	41,1	78,4
2	0,83	0,21	15,000	0,62	41,4	79,0
3	1,04	0,08	21,000	0,96	41,2	78,6
4	1,08	0,11	24,350	0,97	40,2	76,6
5	1,29	0,207	26,450	1,083	40,9	78,0
6	1,11	0,14	24,600	0,97	39,4	75,2
7	0,60	0,09	10,900	0,51	46,8	89,4
8	1,45	0,27	25,000	1,18	47,2	90,1
9	1,06	0,17	19,500	0,89	45,6	87,1
10	1,00	0,31	16,750	0,69	41,2	78,6
11	0,98	0,22	18,400	0,76	41,35	78,9
12	1,17	0,23	22,200	0,94	42,3	80,7
13 ^x	1,30	0,30	22,900	1,00	43,6	83,2
14 ^x	1,23	0,37	19,500	0,86	43,6	82,6
15 ^x	1,41	0,34	24,600	1,03	43,3	82,6

I Kalium-Gehalt eines einzelnen Lymphozyten $\times 10^{-12}$ m val

II K⁺-Gehalt in m val/l der Lymphozyten

^x ungerinnbar nicht wie 1 bis 12 mit Liquemin^R, sondern mit
Natrium-Citrat.

D I S K U S S I O N

Die Diskussion über Isolations-Verfahren zur Gewinnung von Lymphozyten, hauptsächlich zum Zwecke der Gewinnung von Anti-Lymphozyten-Seren entwickelt, zeigt mehrere, sich zum Teil grundlegend unterscheidende Methoden.

Arbeiten, welche von einer Leukozyten-Präparation als Grundlage der Lymphozyten-Isolierung ausgehen, und dies durch Hämolyse der gesamten Erythrozyten erreichten, waren als Grundlage einer Isolation von Lymphozyten zum Zwecke der Bestimmung des intrazellulären K^+ -Gehaltes der Lymphozyten nicht zu verwenden. Hierbei wurde die Hämolyse der Erythrozyten durch hypotonische Lösungen (11), durch Zusatz von dest. Wasser (3;30), oder durch Zusatz von Chemikalien wie Ammonium-Chlorid (20), erreicht. Bei der Hämolyse der Erythrozyten wird das intrazelluläre Kalium der Erythrozyten freigesetzt und somit steigt bei einer Messung das Kalium des "Plasmas" auf ca. 40 m val/l. Bei einer Messung um 40 m val/l wäre, selbst bei Verdünnung, die Fehlerbreite auch noch so genauer Messungen größer als der gesamte Kalium-Gehalt der Lymphozyten.

Auch die Arbeiten, welche auf einer Gewinnung der Lymphozyten aus der durch Drainage des Ductus

thoracicus (25;26) gewonnenen Lymphe beruhen, ließen sich nicht verwerten. Eine Gewinnung von Lymphozyten durch Drainage des Ductus thoracicus konnte, neben dem Nachteil ihrer Kontamination mit Erythrozyten, aus verständlichen Gründen nicht zu einer Bestimmung des Kalium-Gehaltes der Lymphozyten in Versuchs-Serien in Frage kommen.

Leukozyten-Isolierungen, aus denen später noch die Lymphozyten mit großem Aufwand hätten herauspräpariert werden müssen, durch Spontan-Sedimentation (7) oder Differential-Zentrifugation (15;16;32) nach Zusatz hochmolekularer Substanzen, wie Dextran (31;34) oder Polyvinylpyrrolidon (23;24;33;35), führten aufgrund ihrer hohen Kontamination mit Erythrozyten zu keinem befriedigenden Ergebnis im Sinne dieser Arbeit. Gleiches gilt auch für die Differential-Zentrifugation nach vorausgegangener Agglutination der Erythrozyten durch Phytoagglutinine (32) und Methylzellulose (6).

Eine weitere, häufig in der Literatur beschriebene Methode, ist die Trennung durch Flotation in trennenden Medien wie Rinderalbumin (1;11;18;36), "Ficoll", "Isopaque" oder "Ronpacon" (2;19;21), und Jodamid (22). Im Prinzip gehen jene Autoren von der Tatsache des unterschiedlichen spezifischen Gewichtes der einzelnen Blutzellen aus.

Aufbauend auf der Arbeit von Otto und Schmid (22) wurde die Reindarstellung eines Konzentrates unversehrter Lymphozyten, auf dem oben beschriebenen Prinzip beruhend, versucht. Es mußte zur Lymphozyten-Isolierung ein Medium aus einer nicht hämolyisierenden, wasserunlöslichen Substanz gefunden werden, das aufgrund der unterschiedlichen spezifischen Gewichte der einzelnen Blutkörperchen zu einer Trennung der verschiedenen Zellen führt.

Aufgrund der oben beschriebenen Eigenschaften, und da auch die Einstellung eines neutralen pH von 7,0 mit 5%iger Natronlauge entfällt, wird bei der hier beschriebenen Methode zur Lymphozyten-Isolierung, basierend auf Jodamid, eine Verdünnung des Röntgen-Kontrastmittels "Uromiro-Jodamid" verwendet. "Uromiro-Jodamid" ist ein Kombinations-Präparat auf der Grundlage des Jodamid, das ohne vorherige Neutralisation zur Einstellung des spezifischen Gewichtes auf $\rho = 1,076$ durch Zugabe von dest. Wasser zur Lymphozyten-Isolierung herangezogen werden kann. Von den beiden Handelsformen "Uromiro-300" und "Uromiro-380" wurde "Uromiro-300" verwendet. "Uromiro-300" ist eine 65%ige wäßrige Lösung des Methylglucaminsalzes der Acetylamino-methylacetylamino-trijodbenzoesäure mit einem Jodgehalt von 300 mg/ml.

Bei verschiedenen Vorversuchen, welche auf der von Otto und Schmid (22) beschriebenen Methode basierten, zeigte sich neben einer nach eigenen Erfahrungen nicht ganz zu vermeidenden Kontamination der endgültigen Lymphozyten-Präparation mit vereinzelt Erythrozyten (2-5%), eine bei weitem stärkere Kontamination mit Thrombozyten und Monozyten. Diese ließ sich auch bei sorgfältigster Durchführung nicht ganz vermeiden.

Da Thrombozyten in ihrem spezifischen Gewicht zwar etwas leichter sind als Lymphozyten, aber sich doch bei der Zentrifugation vom Plasma aus betrachtet nach unten absetzten, setzten sie sich immer direkt oben auf dem "Lymphozyten-Ring" ab. Die Monozyten, wie die Lymphozyten, mononukleare Zellen, haben nahezu das gleiche spezifische Gewicht wie Lymphozyten und verhalten sich folglich bei dieser Methode genau wie Lymphozyten und lassen sich daher auch nicht von diesen trennen.

Bei eigenen Versuchen nach der von Otto und Schmid (22) beschriebenen Methode der Isolation von Lymphozyten wurde keine absolute Reindarstellung der Lymphozyten erreicht.

Andere Autoren beschrieben die Isolation von Lymphozyten mittels der unterschiedlichen Fähigkeit der verschiedenen Blutzellen zur Adhäsion an großen Oberflächen (4), wie dies bei Watte (10;13), Nylon (8;30;33), Glaswolle und Glasperlen (14;16;17;27;28;29), oder Dederonkreppgewebe (27) der Fall ist.

Granulozyten, aber auch Thrombozyten und Monozyten haften leicht den Oberflächen an, während Lymphozyten und Erythrozyten diesen Effekt fast überhaupt nicht zeigen.

Dies bedeutet nun, daß man zwar bei der Trennung mit Hilfe von Materialien mit großer Oberfläche wie z.B. Nylon-Watte eine Trennung der Lymphozyten von den übrigen Blutzellen, aber mit Ausnahme der Erythrozyten durchführen kann. Eine anschließende Hämolyse der Erythrozyten verbietet sich jedoch, wie oben beschrieben, wegen des enormen Kaliums, das dann in die umgebenden Medien eingebracht würde.

Eigene Überlegungen führten dazu, eine Kombination aus mehreren beschriebenen Isolations-Verfahren zu entwickeln, bei welcher am Ende eine "wirkliche Reindarstellung" von Lymphozyten stammt, die auch eine so diffizile Messung wie die des intrazellulären Kaliums von ein paar Lymphozyten ermöglicht.

Da die Agglutination der Zellen die empfindlichste Stufe der Isolation darstellt, wurde die Trennung mit Hilfe der Nylon-Watte an den Anfang des Isolationsvorganges gestellt. Dadurch wurde das spezifische Gewicht von Erythrozyten und Lymphozyten, die im großen und ganzen die einzigen Zellen im weiteren Ansatz sind, nicht beeinflusst. So konnte der zweite Schritt der Isolation, die Trennung von Erythrozyten und Lymphozyten durch Flotation mittels "Uromiro-Jodamid", eine aufgrund früherer eigener Erfahrungen als zumindest sehr befriedigend erkannte Methode, ohne weiteres zum jetzigen Zeitpunkt des Isolations-Vorganges noch durchgeführt werden.

Der sich als dritte Schritt anschließende Vorgang der Hämolyse durch 0,83%ige Ammonium-Chlorid-Lösung war nur noch nötig, um die bis dahin nahezu reine Lymphozyten-Präparation von einer Restkontamination von bis zu maximal 7% Erythrozyten zu befreien. Der Zuwachs des extrazellulären Kaliums durch Hämolyse der Erythrozyten-Restkontamination beeinträchtigte nun eine Messung des Kalium-Gehaltes der Lymphozyten, wie oben beschrieben, in keiner Weise.

Da sich die Lymphozyten, von dem Augenblick der Zugabe von Ammonium-Chlorid-Lösung an bis Ende

der Isolation in unphysiologischem Milieu, d.h. mit gegenüber in vivo Bedingungen geringeren extrazellulären Kalium-Konzentrationen, befinden, ist ein gewisser Kalium-Verlust der Lymphozyten zumindest während dieses Teiles der Isolation anzunehmen. Leider brachten die Vorversuche, welche Aufschluß über einen möglichen Kalium-Verlust der Lymphozyten auf dem Wege der Diffusion und des Konzentrations-Gefälles von Kalium vom Intrazellulär- zum Extrazellulär-Raum geben sollten, kein verwertbares Ergebnis. Bei den möglichen Kalium-Verlusten während der Isolation handelte es sich um so verschwindend geringe Mengen, daß Messungen dieses Verlustes unter der Fehlerquote bei der Messung des Kalium-Gehaltes des Plasmas lagen. So ist schließlich kein genauer Aufschluß über den wirklichen, in vivo bestehenden Kalium-Gehalt der Lymphozyten zu erhalten gewesen.

Da aber die Methode bei genauer Beachtung aller Versuchsbedingungen und bei genauer Einhaltung der beschriebenen Methode, eine gut reproduzierbare Kalium-Bestimmung der Lymphozyten darstellt, sind bei dieser Methode Verschiebungen des intrazellulären Kalium-Gehaltes bei Lymphozyten schon - wenn auch vielleicht nicht absolut - so sicherlich doch relativ signifikant zu erfassen,

Die Ermittlung der Kalium-Konzentration bei Lymphozyten mit ca. 81,3 m val/l beruht auf der Annahme eines durchschnittlichen Durchmessers der Lymphozyten von 10 . Dabei war auffällig, daß sich in der endgültigen Lymphozyten-Präparation fast ausschließlich sogenannte "kleine Lymphozyten" mit einem Durchmesser von durchschnittlich 10 befanden, obgleich Kontroll-Ausstriche aus dem peripheren Blut der Versuchspersonen immer wieder größere Lymphozyten zeigten. Für dieses Phänomen konnte keine befriedigende Erklärung gefunden werden. Eine mögliche, rein spekulative und in der Literatur nirgends zu findende Erklärung wäre vielleicht, daß sich "große Lymphozyten" in der Eigenschaft der Adhäsion an Materialien großer Oberfläche ähnlich wie Monozyten und andere Leukozyten, und somit anders als kleine Lymphozyten, verhalten. Es war auffällig, daß bei Kontroll-Ausstrichen gleich nach der Filtration durch die Nylon-Watte das Verhältnis von "kleinen" zu "großen" Lymphozyten schon in ähnlicher Weise wie bei der endgültigen Lymphozyten-Präparation gegenüber den Ausstrichen aus dem peripheren Blut verschoben war.

Weiterhin muß berichtet werden, daß bei vielen Ausstrichen der endgültigen Lymphozyten-Präparation eine Agglutination der Lymphozyten gefunden wurde.

Dies kann jedoch wahrscheinlich auf die Ungerinnbarmachung des Blutes mit Liquemin^R zurückgeführt werden und würde sich, wie Kontroll-Versuche zeigten, mit Natrium-Citrat vermeiden lassen. Diese Kontroll-Versuche zeigten jedoch auch, daß die Agglutination der Lymphozyten keinerlei Einfluß auf den Kalium-Gehalt der Lymphozyten hatte.

Über den Zustand der Lymphozyten am Ende des ganzen Isolations-Verfahrens läßt sich feststellen, daß die Lymphozyten bei einer Vitalitäts-Färbung mit Trypanblau bis auf maximal 8% ungefärbt blieben, und auch lichtoptisch bis auf ganz wenige als unversehrt zu betrachten waren.

Z U S A M M E N F A S S U N G

In dieser Arbeit wird erstmals eine Methode zur Bestimmung des K^+ -Gehaltes der Lymphozyten beschrieben. Die Methode der Isolation der Lymphozyten beruht zum einen auf der Tatsache der unterschiedlichen Adhäsion von Granulozyten und Lymphozyten gegenüber Materialien mit großer Oberfläche, in diesem Fall eine Filtration durch eine speziell präparierte Nylon-Watte. Zum anderen beruht die Methode auf einer Trennung der verschiedenen Blutzellen aufgrund ihres unterschiedlichen spezifischen Gewichtes mit Hilfe einer Zentrifugation durch eine "Uromiro-Schicht", eingestellt auf ein spezifisches Gewicht von 1,076.

Beide verschiedene und schon mehrmals beschriebenen Methoden wurden unter Beachtung, daß in einem kaliumfreien Milieu gearbeitet werden mußte, kombiniert.

Der bei dieser Methode ermittelte intrazelluläre Kalium-Gehalt der Lymphozyten beträgt für einen einzelnen Lymphozyten $42,6 \times 10^{-12}$ m val; dies entspricht einer intrazellulären K^+ -Konzentration der Lymphozyten von ca. 81,3 m val/l.

1. AGRANOFF, B.W.
VALLEE, B.L.
WAUGH, D.F.
Centrifugal Subfractionation
of Polymorphonuclear Leukocytes,
Lymphocytes and Erythrocytes.
Blood 9, 804 (1954)

2. AHRONS, S.
KISSMEYER-NIELSEN, F.
Lymphocyte Suspensions for
Tissue Typing Prepared in
15 Minutes.
Vox Sang. 15, 75 (1966)

3. BEHRENS, M.
ESCH, F.
Gewinnung von Leukocyten aus
Rinderblut unter Verwendung
von Wasser als Hämolytikum.
Experientia 19, 406 (1963)

4. BINNS, R.M.
HALL, J.C.
The Paucity of Lymphocytes in
the Lymph of Unanaesthetized
Pigs.
Brit. J. exp. Path. 47, 275
(1966)

5. BÖYUM, A.
Separation of White Blood Cells.
Nature-London 21, 793 (1964)

6. BÖYUM, A.
Isolation of Lymphocytes from
Human Blood - Further Obser-
vations.
Scand. J. Clin. Lab. Invest.
21, Suppl. 97, 31 (1968)

7. COULSON, A.S.
CHALMERS, D.G.
Separation of Viable Lympho-
cytes from Human Blood.
Lancet I, 468 (1964)

8. DAUSSET, A.J. Micro-Lymphocytotoxicity Techniques.
Manual of Tissue Typing Techniques, p. 43
National Institute of Health,
Bethesda, Maryland, USA (1969)
9. ELVES, M.E. Flurochromatic Cytotoxic Test.
Manual of Tissue Typing Techniques, p. 10
National Institute of Health,
Bethesda, Maryland, USA (1969)
10. FALLON, H.J. Leucocyte Preparations for
FREI, E. Human Blood: Evaluation of
DAVIDSON, J.D. their Morphologic and Metabolic
TRIER, J.S. State.
BURK, D. J. Lab. Clin. Med. 59, 779
(1962)
11. FAWCETT, D.W. A Method for Concentration and
VALLEE, B.L. Segregation of Malignant Cells
SOULE, M.H. from Bloody, Pleural, and
Peritoneal Fluids.
Science 111, 34 (1950)
12. FAWCETT, D.W. Studies on the Separation of Cell
VALLEE, B.L. Types in Serosanguinous Fluids,
Blood, and Vaginal Fluids by Flo-
tation on Bovine Plasma Albumin.
J. Lab. Clin. Med. 39, 354 (1952)
13. FICHTELIUS, K.-E. A Simple Method to Separate Lym-
phocytes from the Blood.
Acta Soc. Med. 114, 51 (1961)

14. GARVIN, J.E. Factors Affecting the Adhesiveness of Human Leucocytes and Platelets in vitro.
J. Exper. Med. 114, 51 (1961)

15. GREENWOOD, B. A Simple Double-Centrifugation Technique for the Separation of Sheep Leucocytes.
Vox. Sang. 15, 315 (1968)

16. JAGO, M. A Simple Method for the Separation of Living Lymphocytes from Normal Human Blood.
Brit. J. Haemat. 2, 439 (1956)

17. JOHNSONS, T.M.
GARVIN, J.E. Separation of Lymphocytes in Human Blood by Means of Glass Wool Column.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 102, 333 (1959)

18. KISSMEYER-NIELSEN, F.
KJERBY, K.E. Lymphocytotoxic-Micro-Technique. Purification of Lymphocytes by Flotation, Histocompatibility Testing.
Munks - Gaard, Copenhagen, 381 (1967)

19. KISSMEYER-NIELSEN, F.
KJERBY, K.E. Lymphocytotoxic-Micro-Techniques. Manual of Tissue Typing Techniques, p. 15
National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA (1969)

20. NAGEL, W.
LAHANN, H.U.
WEIHRAUCH, E. Isolierung von Lymphocyten aus peripherem Blut.
Klin. Wochenschrift 36, 34 (1958)

21. NOBLE, P.B.
CUTTS, J.H.
CARROLL, K.K. Ficoll Flotation for the Separation of Blood Leukocyte Types. Blood 31, 66 (1968)

22. OTTO, F.
SCHMID, D.O. Lymphocytenisolierung aus dem Blut des Menschen und der Tiere. Blut 21, 118 (1970)

23. PAYNE, R. Agglutination Technique. Manual of Tissue Typing Techniques, p. 34
National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA (1969)

24. PERTOFT, H.
BÄCK, O.
LINDAHL-KIESSLING, K. Separation of Various Blood Cells in Colloidal Silica-Polyvinylpyrrolidone Gradients. Exper. Cell. Research 50, 355 (1968)

25. PICHLMAYR, R.
BRENDL, W.
BECK, G.
SCHNITTDIEL, E.
TITOW, G.
PICHLMAYR, J. Herstellung heterologer Immunsereen gegen Lymphocyten des Hundes. Klin. Wochenschrift 45, 199 (1967)

26. PICHLMAYR, R.
BRENDL, W.
ZENKER, R. Erfahrungen mit heterologen Anti-Lymphocyten-Seren beim Menschen. Münchn. Med. W'schrift 110 (1968)

27. PREUSSNER, S.
FRICK, G. Die Lymphocyten-Isolierung aus Spenderblut zur Herstellung von Anti-Lymphocyten-Seren. Das Dtsch. Gesundheitswesen 24, 2050. (1969)

28. RABINOWITZ, Y. Separation of Lymphocytes, Polymorphonuclear Leukocytes and Monocytes on Glass Columns, Including Tissue Culture Observations.
Blood 23, 811 (1964)
29. RABINOWITZ, Y. DNA Polymerase and Carbohydrate Metabolizing Enzyme Content of Normal and Leukemic Glass Column Separated Leukocytes.
Blood 27, 470 (1966)
30. ROSENTINE, G.N. 51 CR Release Cytotoxicity Technique.
Manual of Tissue Typing Techniques, p. 21
National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA (1969)
31. ROOD van, J.J. Defined Leukocyte Antigenic Groups in Men.
Manual of Tissue Typing Techniques, p. 38
National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA (1969)
32. SKOOG, W.A.
BECK, W.S. Studies on the Fibrinogen, Dextran and Phytohemagglutinin Methods of Isolating Leukocytes.
Blood 11, 436 (1956)
33. TÄRNVIK, A. Isolation of Lymphocytes from Blood.
Acta Path. Microbiol. Scand. Section B 78, 311 (1970)

34. THIERFELDER, S. A Method for the Isolation of
Human Lymphocytes.
Vox Sang. 9, 447 (1964)
35. TILZ, G.P. Präparation und Aktivitätsbes-
SAILER, S. timmung antilymphozytärer
HESCHEL, R. Seren.
Med. Klinik 64, 1191 (1969)
36. VALLEE, B.L. A Method for the Separation of
HUGHES, W.L. Leukocytes from whole Blood by
GIBSON, J.G. Flotation on Serum Albumin.
Blood 1, 82 (1947)

LEBENS LAUF

Am 18. Oktober 1946 wurde ich, Curt Friedrich Schuler, als Sohn des Arztes Dr. Curt Schuler und seiner Ehefrau Magda Maria Schuler in München geboren.

Nach 4 Jahren Volksschule in Holzen/Isartal besuchte ich bis 1964 das Realgymnasium in Icking, anschließend das Mathematisch-Naturwissenschaftliche Rupprecht-Gymnasium in München, an welchem ich im Juni 1967 die Reifeprüfung ablegte.

Im Winter-Semester 1967/68 begann ich das Studium der Medizin an der Universität München, wo ich im Sommer 1968 das Vorphysikum, im Sommer 1970 das Physikum ablegte.

Das Studium der Medizin beendete ich am 20. Dezember 1973 mit dem bestandenen Staatsexamen an der Universität München.

Januar und Februar 1974 war ich als Medizinal-Assistent an der Chirurgischen Poliklinik der Universität München auf der Abteilung für Anaesthesie tätig. Meine interne Medizinal-Assistentenzeit leistete ich im Krankenhaus Kempfenhausen der Stadt München von März bis September 1974 ab. Von Oktober 1974 bis Februar 1975 war ich als Medizinal-Assistent am Kreis-krankenhaus Wolfratshausen auf der Chirurgischen Abteilung tätig.

Meine Approbation als Arzt erhielt ich vom Bayerischen Staatsministerium des Innern am 4. März 1975.

Seit Mai 1975 arbeite ich als Assistenzarzt in der Herz- und Kreislaufklinik Höhenried der LVA Oberbayern unter Leitung von Professor Dr. Hallhuber.

Mit Einverständnis von Herrn Professor Dr. Doenicke begann ich 1972 mit den experimentellen Arbeiten für meine Dissertation. Nach einer Unterbrechung wegen meines Staatsexamens konnte der experimentelle Teil der Arbeit im Februar 1974 abgeschlossen werden.

Ich bin seit dem 6. Oktober 1972 verheiratet, seit dem 22. September 1974 habe ich einen Sohn.

